

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 333–337

Urinproteinanalysen mit der Diskelektrophorese: Ein Verfahren zur Differentialdiagnose von Nierenerkrankungen

Von H. Rautenstrauch

Abteilung für Nephrologie und Rheumatologie des Zentrums für Innere Medizin (Chefarzt: Prof. Dr. G. Seybold) am Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart

(Eingegangen am 28. Juni/17. Dezember 1976)

Zusammenfassung: Nach einleitenden Bemerkungen über die Rolle der Niere im Proteinstoffwechsel werden die Methode der Diskelektrophorese auf Polyacrylamid unter Verwendung von Detergentien und ihre Ergebnisse beschrieben. Die Auftrennung der Urinproteine nach dem Molekulargewicht erlaubt eine Differenzierung von Nierenerkrankungen in solche glomerulärer und tubulärer Genese, außerdem sind Proteinurien prärenalen und postrenalen Ursprungs abgrenzbar. Der beträchtliche Zeitaufwand verhindert zunächst einen Einsatz im Routinebetrieb.

Analysis of urinary proteins by disc electrophoresis: A method for the differential diagnosis of kidney diseases

Summary: After introductory observations on the role of the kidney in protein metabolism, the methodology and results of disc electrophoresis on polyacrylamide, using detergents, are discussed. Separation of urinary proteins according to molecular weight permits the differentiation of kidney diseases into those of the glomerulus and of the tubules. Proteinurias of prerenal and postrenal origin are also differentiated. Owing to the considerable time involved, this methodology cannot at present be introduced for routine purposes.

Einleitung

Die Rolle der Niere im Stoffwechsel der Plasmaproteine ist in den letzten Jahren zum Teil aufgeklärt worden (1), in vieler Hinsicht aber auch noch Gegenstand intensiver Forschung (2). Zum Verständnis der in dieser Arbeit dargestellten Methode seien die gesicherten Erkenntnisse kurz beschrieben.

Proteine niedrigen Molekulargewichtes ($< 50\,000$) passieren das glomeruläre Filter und werden durch die Tubuluszellen aufgenommen und zu Aminosäuren abgebaut. Für diese Klasse von Proteinen ist die Niere ein primäres Organ des Katabolismus. Bei tubulären Erkrankungen sind Reabsorption und Abbau dieser Proteine niederen Molekulargewichtes gestört, und sie werden im Urin nachweisbar. Proteine mittleren und hohen Molekulargewichtes ($> 60\,000$) werden glomerulär retiniert und passieren die Nieren nur bei Alteration des glomerulären Filters. Der Nachweis dieser Proteine im Urin gibt einen Hinweis für eine glomeruläre Schädigung.

Die Diskelektrophorese auf Polyacrylamid unter Detergentien (Natrium-Dodecylsulfat) ermöglicht eine Auf-

trennung der Urinproteine nach dem Molekulargewicht und erlaubt dadurch eine Differenzierung von Nierenerkrankungen in solche glomerulärer und tubulärer Genese. Außerdem sind Proteinurien prärenalen (Bence-Jones-Proteinurie) und postrenalen (Immunglobulinsekretion im Tubulus) Ursprungs abgrenzbar (3–6).

Gegenüber anderen Methoden zur Differenzierung der Proteinurien (Gelfiltration, Ultrazentrifugation, Immundiffusion) besitzt die Diskelektrophorese die Vorteile geringen Zeitaufwandes und größerer Präzision (1, 3). Die weit verbreitete Acetatfolien- bzw. Papierelektrophorese ist für die gegebene Fragestellung ungeeignet, da Fraktionen, die unterhalb des Molekulargewichtes des Albumins liegen, nicht erfaßt werden. Die neuerdings angegebene Mikroelektrophorese in kontinuierlichen Polyacrylamid-Gradientengelen (7) kann ohne die zeitraubende Urinkonzentration erfolgen und erfordert nur eine kurze Trennzeit, ein Vorteil, wenn die methodisch erforderliche „Urinkonzentration von 0,1 bis 1,0 g/l Protein“ (7) vorliegt oder sogar überschritten ist. Die Aussagefähigkeit der Methode bei niedrigeren Urinproteinkonzentrationen ist noch nicht eindeutig belegt.

Methodik

50 ml Morgenurin werden mit Labstix auf Blut, pH, Protein geprüft, zentrifugiert und dann entsprechend ihrem Protein-Gehalt 100- bzw. 200-fach konzentriert. Die Konzentration erfolgt mit Kollodiumhülsen (Sartorius-Membranfilter SM 132 00), einer Haltevorrichtung (SM 263 14) und einer Vakuumpumpe (Drehschieberpumpe v. Leybold-Heraeus). Die konzentrierten Urine werden bei -20°C aufbewahrt.

Die Diskelektrophorese wurde mit der Flachgel-Elektrophorese-Apparatur von Desaga durchgeführt.

Reagenzien

Elektrophorese-Puffer

0,1 mol/l sek. Natriumphosphat, 17,3 mmol/l Natriumdodecylsulfat mit 1 mol/l HCl auf pH 7,40 einstellen (Merck).

7,5 g/l Polyacrylamid Gel

4050 mg Acrylamid und 105 mg Bisacrylamid werden in 50 ml Elektrophorese-Puffer gelöst, jetzt werden 4 ml 0,043 mol/l Ammoniumpersulfatlösung und 25 μl TEMED hinzugefügt (alle Substanzen von Fa. Serva).

Arbeitsweise

Die Lösung für das Gel wird, wie oben beschrieben, zubereitet, gut gemischt und in den Arbeitsblock (Desaga) gefüllt, mit dest. Wasser überschichtet, dann wird der Teflon-Kamm für 10 Geltaschen hineingesteckt. Die Polymerisationsdauer beträgt 30 min. Während der Polymerisation wird der Block gekühlt und nach Beendigung das überschichtete Wasser wieder vorsichtig abgesaugt. Der Arbeitsblock wird in die Trennkammer eingebaut und der Elektrophorese-Puffer eingefüllt.

Probenvorbereitung

50 μl Elektrophorese-Puffer, 20 μl konzentrierten Urin, 5 μl Glycerin und 5 μl 0,5 g/l Bromphenolblaulösung gut mischen und mit einer Hamilton-Spritze 20–40 μl pro Geltasche auftragen.

Die Trennung erfolgt bei 60–70 mA (Netzgerät v. Desaga), Dauer 5–6 h. Die Färbung wird mit 8 g/l Amidoschwarz in 1,16 mol/l Essigsäure durchgeführt, Dauer 2 Stunden.

Die Entfärbung in 1,16 mol/l Essigsäure erfolgt elektrophoretisch, Entfärbungsdauer etwa 10 Stunden. Die Auswertung erfolgt mit dem Vitatrendensitometer, der Zeitbedarf beträgt bei 10 Proben etwa 1 Stunde.

Ergebnisse

Im folgenden sind einige typische Befunde, die mit der beschriebenen Methode erhoben werden konnten, zusammengestellt.

Abbildung 1 ist ein Originalstreifen einer Polyacrylamid-Natriumdodecylsulfat-Elektrophorese mit 10 aufgetragenen Urinproben.

Albumin (Molekulargewicht 65 000 Dalton) stellt fast immer die Hauptkomponente, bei Untersuchung eines Normalurins die einzige Komponente dar. Banden mit einem Molekulargewicht über 65 000 liegen in unserem Beispiel kathodenwärts von Albumin, die mit einem Molekulargewicht unter 65 000 anodenwärts. Eine sichere Charakterisierung der einzelnen Banden ist zu

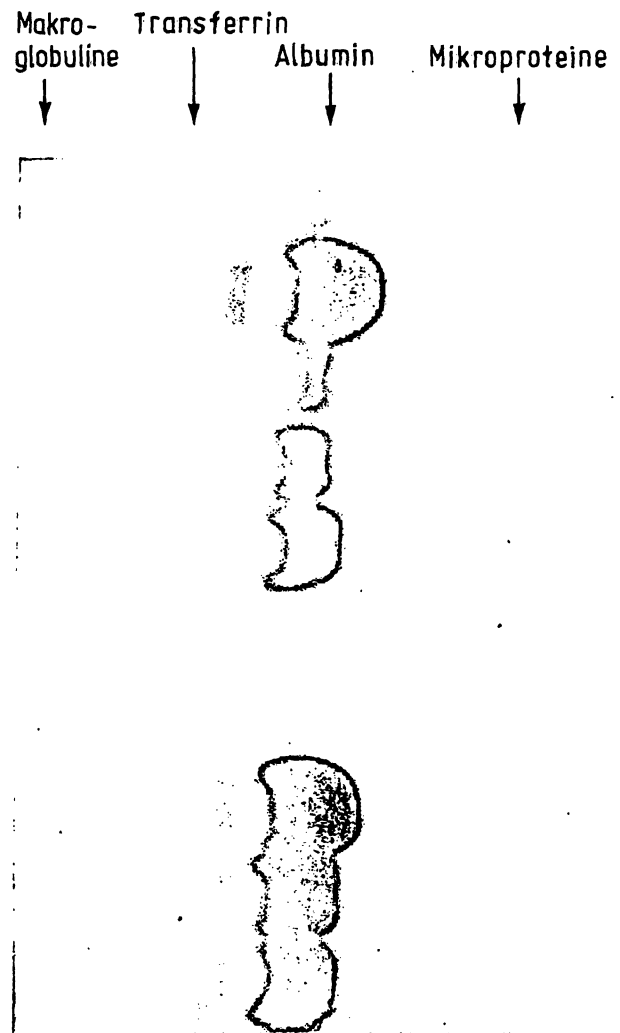


Abb. 1. Mit Polyacrylamidgel-Natriumdodecylsulfat-Elektrophorese getrennte Fraktionen nach Anfärbung.

erreichen, wenn man sie mit der Mobilität von Proteinen bekannten Molekulargewichtes vergleicht oder sie immunochemisch untersucht. In der Praxis gestatten visuelle Beurteilung und Erfahrung eine Differenzierung der getrennten Fraktionen, vor allem unter Benutzung der in der Folge gezeigten densitometrischen Kurven.

Abbildung 2a zeigt den Befund einer tubulären Proteinurie bei bakterieller interstitieller Nephritis.

Links sieht man einen kleinen Transferrinpeak, rechts neben dem doppelgipfligen Albumin finden sich vier verschiedene Fraktionen niedermolekularer Proteine. Generell sind fünf Mikroproteinfraktionen möglich, die auch mit T_1 – T_5 bezeichnet werden (3, 8). Es handelt sich dabei um α_1 -Antitrypsin (MG 54 000), freie Leichtketten der Immunglobuline in di- (MG 44 000) und monomerer Form (MG 22 000), Retinol-bindendes-Protein (MG 21 000) und β -2-Mikroglobulin (MG 12 000).

Proteine, deren Molekulargewicht unter 10 000 liegen, werden mit der Diskelektrophorese aus methodischen Gründen nicht erfaßt.

Abbildung 2b gibt die Veränderungen einer selektiven glomerulären Proteinurie bei „minimal change nephritis“ wieder.

Neben dem stark ausgeprägten Albuminpeak sieht man einen kleineren Transferrinpeak.

Abbildung 2c zeigt eine unselektive glomeruläre Proteinurie bei immunhistologisch gesicherter perimembranöser Glomerulonephritis. Neben Albumin und Transferrin sieht man zusätzlich eine IgG-Bande, möglicherweise als Ausdruck einer Basalmembranschädigung. Bei dem Beispiel der folgenden Abbildung 2d handelt es sich ebenfalls um eine unselektive glomeruläre Proteinurie bei diabetischer Glomerulosklerose und Arterio-Arteriosklerose der Nieren. Im Unterschied zum vorhergehenden Diskelektrophoresebild wird neben Albumin, Transferrin und IgG auch IgM ausgeschieden. Man sieht also, daß bei unselektiver glomerulärer Proteinurie durchaus Variationen möglich sind. Charakteristisch ist jedoch,

daß die Molekulargewichte der ausgeschiedenen Proteine zwischen 65 000 und 1 000 000 liegen. Kennzeichen der selektiven Proteinurie ist hingegen, daß nur Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 65 000 und 100 000 in den Urin übertreten.

Die Proteinbanden der glomerulären Proteinurie wurden entsprechend der tubulären auch mit G_1 , G_2 (Transferrin), G_3 , G_4 (7^S -IgG), G_5 und G_6 (α_2 -Makroglobulin, IgM) bezeichnet.

Tubuläre und glomeruläre Proteinurien kommen häufig zusammen vor (s. Abb. 2e). Ein Maß zur Differenzierung solcher gemischter Proteinurien ist die Glomerulo-Tubuläre Protein Ratio (GTRR = Menge der Proteine $MG > 90\,000$ / Menge der Proteine $MG < 65\,000$), die bei überwiegend tubulären Formen unter 1 liegt (3).

In der Abbildung 2f sind eine prärenale (Bence-Jones) bei gleichzeitiger postrenaler (tubuläre IgG-Sekretion) Proteinurie bei Plasmocytom wiedergeben. Neben der

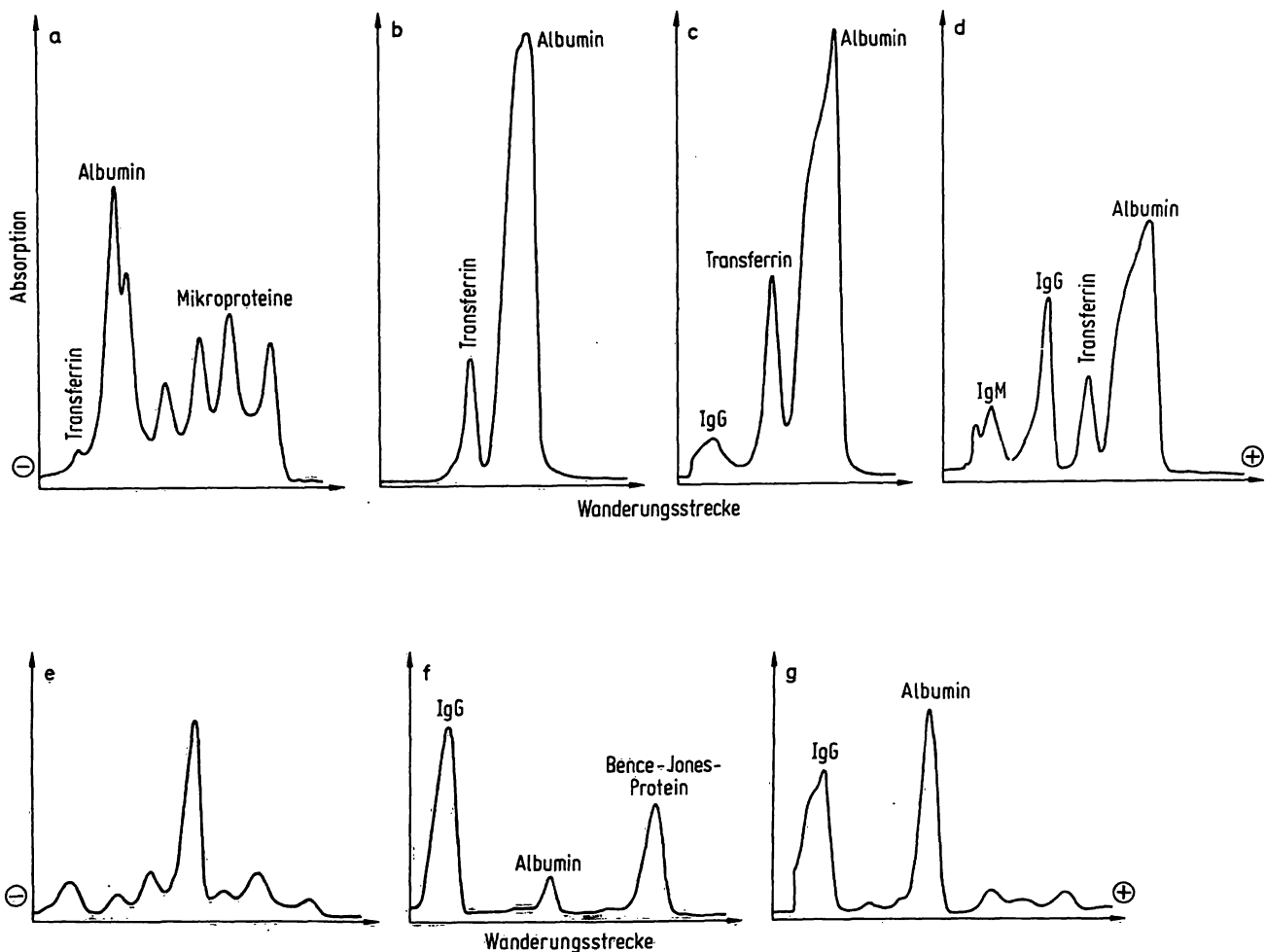


Abb. 2. Densitogramme von mit Polyacrylamid-Natriumdodecylsulfat-Elektrophorese getrennten Harnproteinen.

- Tubuläre Proteinurie bei bakterieller interstitieller Nephritis.
- Selektive glomeruläre Proteinurie bei „minimal change nephritis“.
- Unselektive glomeruläre Proteinurie bei perimembranöser Glomerulonephritis.
- Unselektive glomeruläre Proteinurie bei diabetischer Glomerulosklerose und Arterio-Arteriosklerose der Nieren.
- Tubuläre und glomeruläre Proteinurien.
- Prärenale (Bence-Jones) und gleichzeitig postrenale (tubuläre IgG-Sekretion) Proteinurie bei Plasmocytom.
- Tubuläre Proteinurie mit begleitender tubulärer Immunglobulinausscheidung.

kleinen Albuminzacke in der Mitte sieht man anodenwärts das *Bence-Jones*-Protein und kathodenwärts das IgG. Die Monoklonalität wurde durch Immunelektrophorese gesichert.

Die isolierte Ausscheidung von Immunglobulinleichtketten in dimerer Form (Molekulargewicht 44 000) unterscheidet die prärenale Proteinurie von der in Abbildung 2a dargestellten tubulären Proteinurie, bei der mehrere Proteine aus dem Ultrafiltrat nicht aufgenommen werden. Infolge der hohen renalen Clearance der *Bence-Jones*-Proteine entstehen hohe tubuläre Konzentrationen, die die vorhandene Resorptionskapazität überschreiten und den Nachweis im Urin ermöglichen. Das IgG wird im vorliegenden Beispiel tubulär sezerniert, da bei glomerulärer Schädigung zusätzlich Transferrin ausgeschieden werden müßte.

Postrenale Proteinurien kommen oft als begleitende Immunglobulinausscheidung in Verbindung mit einer tubulären Proteinurie, z. B. im Rahmen einer Urosepsis, vor (Abb. 2g). Auch hier erlaubt die nur geringfügige Transferrinurie den Ausschluß einer glomerulär bedingten Form.

Diskussion

Die abgebildeten Kurven demonstrieren, daß bei tubulärer und glomerulärer Proteinurie Albumin die Hauptkomponente ist. Dieser Befund kann nicht eindeutig interpretiert werden, da keine sicheren Kenntnisse über das Schicksal des Albumins im renalen Proteinhaushalt vorliegen. Während früher angenommen wurde, daß Albumin im Primärharn erscheint und durch die Podocyten rückresorbiert wird, neigt man neuerdings zu der Auffassung, daß erst Ladungsänderungen im Kapillarlumen die Filtrierbarkeit ermöglichen (2, 9).

Tubulär bedingte Proteinurien liegen quantitativ in der Regel unter 2 g/d (Ausnahme: Zustand nach Nierentransplantation). Die Zahl der ausgeschiedenen Mikroproteine ist im Einzelfall ebenso variabel, wie das quantitative Verhältnis der einzelnen Mikroproteine untereinander. Kürzlich ist eine Methode angegeben worden (10), tubuläre Proteinurien in zwei Typen zu unterteilen: Der erste Typ enthält Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 000 und 70 000 und wird bei entzündlichen tubulären Erkrankungen gesehen. Der zweite Typ enthält nur Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 40 000 und 70 000 und soll bei degenerativen nephrosklerotischen Veränderungen (hypertensiv oder diabetisch) auftreten.

Aufgrund vergleichender histologischer und diskelektrophoretischer Untersuchungen anderer Autoren (3, 6, 8, 11, 12) und eigener Ergebnisse finden sich tubuläre Pro-

teinurien bei interstitieller Nephritis, akutem Nierenversagen, Stoffwechselerkrankungen (Cystinose, Oxalose), degenerativen Tubulusschäden, nach Kadaver-nierentransplantation; seltener im Ablauf schwerer Allgemeinerkrankungen (z. B. Endocarditis lenta, Colitis ulcerosa, M. Crohn) und als Begleiterscheinung primärer glomerulärer Erkrankungen.

Bei Proteinurien glomerulären Ursprungs kann man formal zwischen einer selektiven und einer, häufiger zu beobachtenden, unselektiven Form unterscheiden (Abb. 2b–d). Diese Begriffe bezeichnen wahrscheinlich einen funktionellen Zustand. Eine sichere Zuordnung zu bestimmten histologischen Bildern einer Glomerulonephritis ist nach unseren Erfahrungen nicht möglich. Eine glomeruläre Proteinurie, ob selektiv oder unselektiv, zeigt jedoch immer eine glomeruläre Schädigung an und wurde bei den unterschiedlichen Formen der Glomerulonephritis, bei diabetischer Glomerulosklerose, Arterio-Arteriolsklerose, Amyloidose und, überraschenderweise, bei der orthostatischen Proteinurie gefunden (3, 6, 8, 11, 12). Eine massive glomeruläre Proteinurie über 8 g/d kann den Nachweis von Mikroproteinen unmöglich machen.

Die beschriebene Methode ist eine wertvolle Hilfe in der Differentialdiagnose von Nierenerkrankungen. Da die Untersuchungen beliebig oft wiederholt werden können, eignet sich das Verfahren besonders für Verlaufsbeobachtungen und für die Feststellung der Ausheilung einer renalen Schädigung. Aussagen können nicht nur bei quantitativ erhöhter Proteinausscheidung, sondern auch bei physiologischen Proteinurien gemacht werden. Dabei ist eine 200-fache Konzentrierung des Urins erforderlich.

Eine quantitative Beurteilung der getrennten Proteine ist zwar bei Vorhandensein eines leistungsfähigen Densitometers mit bestimmten Einschränkungen möglich (2). Sie bringt aber in der klinischen Praxis gegenüber der quantitativen Aussage (sichere Differenzierung von glomerulären und tubulären Proteinurien sowie Abgrenzung prärenal und postrenal Proteinurien) keinen entscheidenden Vorteil. So wird z. B. die Mikroprotein-clearance nicht nur vom Ausmaß des tubulären Schadens, sondern auch von der glomerulären Filtration dieser Proteine mit einem Molekulargewicht unter 65 000 beeinflusst. Während die 24-Stunden-Eiweißausscheidung bei chronisch-interstitieller Nephritis meist unter 2 g liegt, finden sich nach Nierentransplantation Werte bis zu 5 g. In beiden Fällen sind neben Albumin Mikroproteinfraktionen nachweisbar, deren quantitative Erfassung keinen Informationsgewinn darstellen würde. Eine Kontrolle über die Zuverlässigkeit der gewonnenen Ergebnisse ist dadurch möglich, daß man entweder Proteine bekannten Molekulargewichtes oder bereits früher getrennte Urinproben von Patienten mit bekannter Grunderkrankung nochmals mitlaufen läßt. Bei mehrfacher Analyse eines

Urins des gleichen Patienten konnte immer das gleiche „Eiweißbild“ reproduziert werden.

Ein Nachteil für den Routinebetrieb ist der beträchtliche Zeitaufwand (einschließlich der Urinkonzentrierung für 10 Urinproben 2 Tage, bei etwa 4 Stunden reiner Arbeits-

zeit), die Methode muß deshalb zunächst speziellen Fragestellungen vorbehalten bleiben.

Danksagung

Frl. U. Krüger danke ich für die technische Assistenz.

Literatur

1. Strober, W. & Waldmann, Th. A. (1974), *Nephron* 13, 35–66.
2. Deen, W. M., Chang, R. L. S., Robertson, C. R., Benett, C. M., Glassok, R. J. & Brenner, B. M. (1975), VIth International Congress of Nephrology, Florenz 8.–12, 1975. Abstracts of Symposia.
3. Boesken, W., Kopf, K. & Schollmeyer, P. (1973), *Clin. Nephrol.* 1, 311–318.
4. Pesce, A. J., Boreisa, I. & Pollack, V. J. (1972), *Clin. Chim. Acta* 40, 27–34.
5. Pesce, A. J. (1974), *Nephron* 13, 93–104.
6. Virella, G., Pires, M. T. & Maraves Coelho, J. (1974), *Clin. Chim. Acta* 50, 63–75.
7. Reichel, W., Wolfrum, D. I., Klein, R. & Scheler, F. (1976), *Klin. Wochenschr.* 54, 19–24.
8. Boesken, W. (1975), *Klin. Wochenschr.* 53, 473–479.
9. Knox, G. F. & Schneider, E. G. (1974), *Nephron* 13, 67–81.
10. Batsford, S., Bohnart, C., Boesken, W. & Kluthe, R. (1975), Abstract, *Kidney Int.* 8, 405.
11. Höfer, W., Missgeld, W. & Baethker, R. (1974), *Protides Biol. Fluids, Proc. Colloq.* 21, 459–462.
12. Wibell, L. & Evrin, P. E. (1974), *Protides Biological Fluids, Proc. Colloq.* 21, 519–523.

Dr. H. Rautenstrauch
Auerbachstraße 110
D-7000 Stuttgart 50

